

# Biorremediação de fosfatos e ferro: Utilização de *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato de sódio

Laura Carolina Ferreira Gonçalves Abreu

Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água

Departamento de Biologia

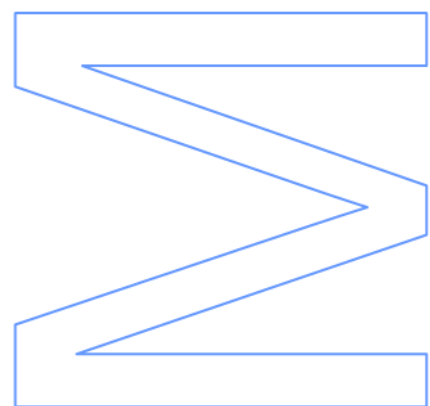
2013

**Orientadora:**

Maria da Natividade Ribeiro Vieira

Professora Associada com Agregação

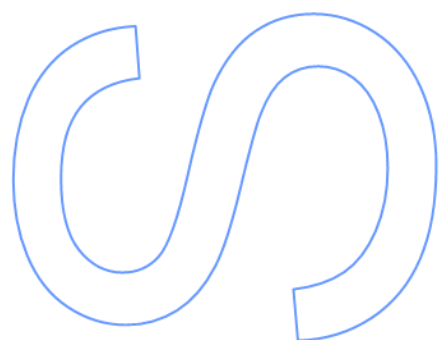
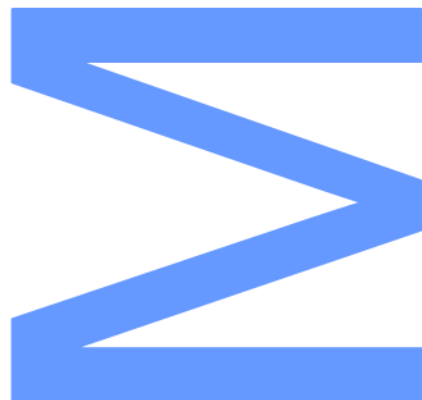
Faculdade de Ciências, Universidade do Porto



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



## Agradecimentos

Quero começar os meus agradecimentos com uma célebre frase de Albert Einstein, que traduz os meus sentimentos no início desta minha jornada, que passo a citar, “ Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança saber que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é”.

Por isso começo por agradecer a Professora Doutora Natividade Vieira por se ter disponibilizado a ser minha orientadora. Quero deixar o meu muito obrigada pela paciência e toda a orientação dada para melhorar o meu trabalho, e pelo apoio que me deu em todas as fases complicadas pelas quais passei.

Quero agradecer o Sr. Gonçalves e ao Engenheiro Manuel Silva da Empresa Termolan que permitiram a recolha da água e também pelo carinho, atenção e ajuda que me ofereceram.

Em especial aos meus pais, que foram e são os meus pilares, aqueles que alimentam todos os meus sonhos e que nas horas difíceis estão sempre presentes para me apoiar com todo o amor que lhes é característico.

Ao Vitor Almeida, por todo o apoio e amizade que demonstrou, e por todas as conversas de incentivo e de cultura.

Não me posso esquecer de todos os colegas do mestrado pelo apoio que sempre me prestaram. E também a todos os meus amigos do coração pelo palavras de animo e de preocupação.

Todas estas pessoas contribuíram de certa forma para que aquela criancinha que eu me sentia no início se fortalece-se.

“Talvez não tenha conseguido fazer melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”  
(Marthin Luther King)

## Resumo

A crescente escassez de fontes de água para atender às necessidades da sociedade e aos avanços tecnológicos vem introduzir um novo conceito no tratamento de águas residuais, que consiste na recuperação, reciclagem e reutilização da água. A reutilização a nível industrial tem tido um papel importante, pois preenche as lacunas que existiam a nível ambiental e económico no tratamento de águas industriais. No entanto apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, perdas em termos de vida de órgãos, equipamentos e tubagens devido a corrosões e incrustações.

As microalgas oferecem uma solução eficaz para tratamentos de água residual, devido à sua capacidade de assimilar fosfato e também a sua capacidade de remoção de metais pesados. Este trabalho tem o objetivo de unir as vantagens do uso de culturas de algas para minimizar as desvantagens do uso de águas reutilizadas. O estudo baseou-se na técnica de biorremediação aplicada a uma água residual industrial. Procedeu-se à remoção de fosfatos e ferro através da imobilização da microalga *Chlorella vulgaris* em alginato de sódio.

Com os resultados obtidos podemos considerar que houve uma redução de fosfato e ferro, mas no entanto seria recomendado novos estudos, tendo como prioridade um melhor conhecimento das características físico-químicas da água.

Palavras chave: biorremediação; microalgas; alginato de sódio ; água residual industrial e reutilização

## Abstract

The growing shortage of water sources to meet the necessities of the society and technological advances, introduce a new concept for the treatment of wastewater, which consists in the recovery, recycling and reuse of water. The industrial reuse level has had an important role, as it fills the existing environmental and economic gaps in industrial wastewater treatment. However presents some disadvantages, such as loss of life in terms of organs, the equipment and pipes due to corrosion and fouling.

The microalgae provide an efficient solution for the treatment of wastewater, Due to its ability to absorb phosphate, and also their ability to remove heavy metals. This work aims to unite the advantages of using algae cultures to minimize the disadvantage of the use of reused water. The study was based on the bioremediation technique applied to industrial wastewater. Proceeded to the removal of phosphates and iron through the immobilization of the microalgae *Chlorella vulgaris* in sodium alginate.

With the obtained results we can consider that it would be recommended a new study, having as priority a better understanding of the physical-chemical characteristics of this water.

Keywords: bioremediation; microalgae; alginate; industrial wastewater and reuse

<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Águas residuais</i> .....	2
1.1.1. Recuperação e reutilização de águas residuais. ....	3
1.1.2. Qualidade da água utilizada na indústria .....	6
1.2. <i>Biorremediação</i> .....	7
1.2.1. Tipos de biorremediação .....	8
1.2.1.1. Vantagens da biorremediação: .....	8
1.2.1.2. Desvantagens da biorremediação .....	9
1.2.2. Fitorremediação .....	9
1.3. <i>Microalgas</i> .....	10
1.3.1. Imobilização de microalgas para tratamento de águas residuais .....	11
1.3.2. Remoção de nutrientes da água residual pelas microalgas imobilizadas	13
1.3.3. Remoção de metais pesados de águas residuais pelas microalgas imobilizadas.....	14
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>16</b>
<b>3. Material e Metodologia .....</b>	<b>16</b>
3.1. <i>Amostragem</i> .....	16
3.2. <i>Microalga utilizada</i> .....	17
3.2.1. Preparação do meio e início da cultura de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	17
3.3. <i>Matriz de gel escolhida</i> .....	19
3.3.1. Preparação da solução de alginato de sódio e de cloreto de cálcio .....	20
3.3.2. Preparação das esferas de alginato e imobilização das microalgas.....	20
3.4. <i>Desenho experimental</i> .....	21
3.5. <i>Técnicas de lavagem de material e preservação de amostras para testes físico-químicos</i> .....	22
3.6. <i>Análise das amostras</i> .....	23
3.7. <i>Análise estatística</i> .....	23
<b>4. Resultados .....</b>	<b>24</b>

4.1. Remoção de fosfatos .....	24
4.2. <i>Remoção de ferro</i> .....	25
<b>5. Discussão.....</b>	<b>27</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>29</b>
<b>7. Bibliografia .....</b>	<b>30</b>
<b>8. Bibliografia eletrónica .....</b>	<b>34</b>
<b>9. Anexos .....</b>	<b>35</b>

## Lista de figuras

Figura 1 – Papel da engenharia no tratamento, recuperação e reutilização de instalações na ciclagem da água através do ciclo hidrológico (Metcalf and Eddy, 2003).....	4
Figura 2 – <i>Chlorella vulgaris</i> .....	11
Figura 3 – Sistema da cultura de <i>Chlorella vulgaris</i> . A-tubo de arejamento; B-tubo para saída da cultura; c-tubo de pressão.....	19
Figura 4 – Formação do alginato (Covizzi et al., 2007).....	21
Figura 5 – Esquema da experiencia de remoção de fosfatos e ferro da água residual industrial por células imobilizadas nas esferas. IC- e IC+ concentrações imobilizadas nas esferas; AR e EV controlos.....	22
Figura 6 – Resultado da análise de variância ANOVA para assimilação de fosfatos na água residual. O valor sig é superior a 0,05, logo no final da experiencia não houve diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes réplicas.....	36
Figura 7 - Resultado da análise de variância ANOVA para assimilação de ferro na água residual. O valor sig é superior a 0,05, logo no final da experiencia não houve diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes réplicas.....	36
Figura 8 – Resultado da análise de variância ANOVA para assimilação de fosfatos na água residual. O valor sig é superior a 0,05, logo no final da experiencia não houve diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos.....	36
Figura 9 –Resultado da análise de variância ANOVA para assimilação de ferro na água residual. O valor sig é superior a 0,05, logo no final da experiencia não houve diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos.....	36
Figura 10 – Assimilação de fosfatos pela <i>Chlorella vulgaris</i> imobilizada em alginato. IC- imobilizada concentração baixa; IC+ imobilizada concentração alta; AR água residual; EV esferas vazias.....	25
Figura 11 – Assimilação de ferro pela <i>Chlorella vulgaris</i> imobilizada em alginato. IC- imobilizada concentração baixa; IC+ imobilizada concentração alta; AR água residual; EV esferas vazias.....	26



## Lista de Tabelas

Tabela 1-Aplicações e condicionantes da reutilização de águas residuais tratadas (e Monte &Albuquerque, 2010). .....	4
Tabela 2-Remoção de azoto e fósforo por microalgas imobilizadas (De-Bashan & Bashan, 2010) .....	14
Tabela 3-Remoção de metais pesados e outros poluentes por microalgas, macroalgas e cianobactérias imobilizadas (De-Bashan & Bashan, 2010). .....	15
Tabela 4-Lista de macro e micronutrientes, tampão e vitaminas do meio MBL. ....	18
Tabela 5-Média das concentrações e respetivos desvios padrão, dos fosfatos (mg/L), obtidos para a água residual industrial. ....	24
Tabela 6-Média das concentrações e respetivos desvios padrão, do ferro (mg/L), obtidos para a água residual industrial. ....	26

## Lista de abreviaturas

MBL - Marine Biological Culture

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais.

# 1.Introdução

A água é o recurso natural mais valioso do planeta, pelo que a sua conservação constitui um dos mais importantes pilares do desenvolvimento sustentável. Nas regiões em que a escassez de recursos hídricos constitui uma realidade natural e naquelas em que o crescimento demográfico e/ou as alterações climáticas perspetivam essa escassez, a gestão sustentável dos recursos hídricos implica a conservação destes recursos e inclui, por conseguinte, a reutilização da água. Noutras situações de menor escassez de água, a reutilização é praticada por imperativos de proteção ambiental dos meios recetores. A água reutilizada tem várias finalidades, nomeadamente: a rega agrícola, a rega paisagística (aplicação na qual se destaca a rega de campos de golfe), a reutilização industrial (principalmente como reciclagem de água de arrefecimento), a recarga de aquíferos, determinados usos recreativos e ambientais, usos urbanos que não obrigam à utilização de água potável e até como reforço de origem de água bruta para produção de água para consumo humano (Monte & Albuquerque, 2010).

O uso de sistemas biológicos serve como uma forma barata e eficiente de remoção de nutrientes e metais pesados de águas residuais, podendo até ultrapassar algumas limitações dos tratamentos físicos e químicos (Hameed, 2007; Hameed, 2006). Sistemas de algas têm sido tradicionalmente utilizadas como um procedimento terciário e, recentemente, têm sido propostos como um sistema de tratamento secundário. Um dos principais problemas com a utilização de microalgas para o tratamento de águas residuais é a sua recuperação a partir do efluente tratado. A tecnologia de imobilização, que aprisiona as células de microalgas numa matriz tem oferecido um maior grau de flexibilidade operacional e fácil separação. Muitos autores relatam que a *Chlorella* é uma espécie comum e eficaz para a imobilização e fins de remoção de nutrientes (Hameed, 2007) e metais pesados (Hameed 2006). O alginato é o polímero mais frequentemente utilizado para a imobilização de algas (Hameed, 2007).

## 1.1. Águas residuais

A compreensão da natureza das águas residuais é essencial no projeto e operação de recolha, tratamento e disposição das instalações e na gestão da engenharia de qualidade ambiental. Portanto engenheiros, químicos e biólogos têm trabalhado por muitas décadas para desenvolver a purificação de águas residuais e estações de tratamento (Muttamara, 1996), no sentido de aumentar a proteção da saúde pública, de forma compatível com as preocupações ambientais, económicos, sociais e políticos. Para proteger a saúde pública e o ambiente é necessário ter conhecimentos de:

- Constituintes que causam preocupação em águas residuais;
- Os impactos destes constituintes quando as águas residuais são dispersas no ambiente;
- A transformação e destino a longo prazo destes constituintes nos processos de tratamento;
- Métodos de tratamento que podem ser utilizados para remover ou modificar os constituintes encontrados nas águas residuais;
- Métodos para o uso benéfico ou de eliminação dos sólidos gerados pelos sistemas de tratamento (Metcalf & Eddy, 2003).

A qualidade da água tratada, definida em função da legislação vigente de acordo com o uso a que se destina, é assegurada pela passagem sequencial da água residual por uma série de operações e processos unitários onde a concentração dos diferentes poluentes vai sendo gradualmente reduzida. De uma forma geral, estes tratamentos não fazem mais do que simular os processos de depuração natural da água, mas de uma forma célere e com um maior grau de controlo. É comum classificar os tratamentos de águas residuais, de acordo com o grau de remoção de poluentes que garantem, em:

1. Tratamentos preliminares – têm como principal objetivo remover substâncias e materiais que poderiam provocar danos aos equipamentos a jusante (ex. plásticos e sólidos de grandes dimensões, areias, etc;
2. Tratamentos primários – processos físico-químicos que removem outros sólidos sedimentares e flutuantes (ex. óleos e gorduras) produzindo efluentes

- com qualidade aceitável para a descarga em águas pouco sensíveis ou a redução da carga poluente da água para seguir para o tratamento secundário;
3. Tratamentos secundários – removem matéria orgânica biodegradável suspensa e dissolvida por ação de processos biológicos, produzindo efluentes com qualidade aceitável para descarga ou para serem encaminhados para tratamentos de afinação;
  4. Tratamentos terciários – são tratamentos físicos, químicos e/ou biológicos que se destinam a remover carga orgânica adicional, sólidos, nutrientes (azoto e fósforo), microrganismos patogénicos e/ou substâncias tóxicas (Ferraz & Rodrigues, 2011).

### **1.1.1. Recuperação e reutilização de águas residuais.**

Com o crescimento populacional e a diversificação das atividades antrópicas, automaticamente preocupações e uma grande pressão sobre os recursos hídricos são gerados, tornando-se escasso e inapropriado o abastecimento humano, desencadeando, assim uma maior procura por alternativas para uma melhor gestão desses recursos (Mancuso & Santos, 2003).

A introdução planeada da recuperação, reciclagem e reutilização da água em sistemas de recursos hídricos reflete a crescente escassez de fontes de água para atender às necessidades da sociedade, os avanços tecnológicos, aumento da aceitação do público e melhor compreensão dos riscos para a saúde pública (Asano & Levine, 1996). Tradicionalmente o ciclo hidrológico tem sido usado para representar o transporte contínuo de água no ambiente. O ciclo da água é composto por recursos de água doce, água subterrânea, água associada a várias funções de uso do solo, e vapor de água atmosférico. Recuperação, reciclagem e reutilização de água representam componentes importantes do ciclo hidrológico em áreas urbanas, industriais e áreas agrícolas, como mostra a figura 1 (Metcalf & Eddy, 2003).

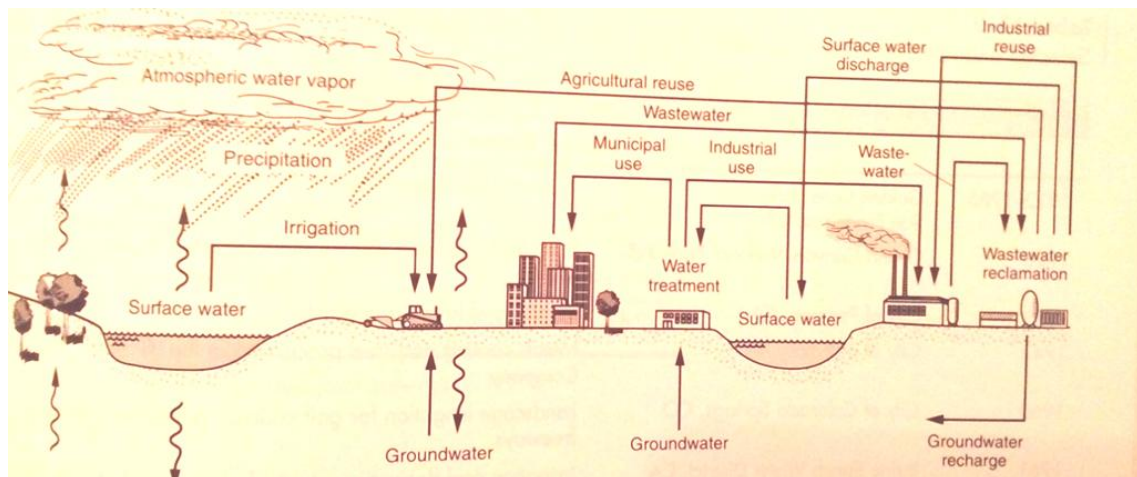


Figura 1-Papel da engenharia no tratamento, recuperação e reutilização de instalações no ciclo da água através do ciclo hidrológico (Metcalf & Eddy, 2003).

A água utilizada ou reutilizada para indústria, recarga de aquíferos, usos recreativos e ambientais, usos urbanos não potáveis e para irrigação agrícola e de paisagens, apresentam diversas aplicações e condicionamentos como podemos verificar na tabela 1 (Monte & Albuquerque 2010).

Tabela 1-Aplicações e condicionantes da reutilização de águas residuais tratadas (e Monte & Albuquerque, 2010).

Aplicação		Condicionantes
Rega Agrícola	Viveiros de árvores e plantas	Necessidade de zona tampão.  Comercialização das culturas.  Saúde pública.  Controlo dos aerossóis e drenagem.
	Culturas alimentares, forragens, cereais, fibras.	
	Proteção contra as geadas.	
	Silvicultura.	
Rega paisagística	Campos de golfe.	Controlo de desinfecção.  Saúde pública.  Aceitação pública  Controlo dos aerossóis.
	Faixas separadoras e margens de auto-estrada	
	Parques públicos.	
	Campus escolares.	

	Cemitérios.	Drenagem.
	Jardins residências.	Ligações cruzadas com rede de água potável.
Indústria	Água de arrefecimento.	Aerossóis.
	Lavagem de equipamento.	Ligações cruzadas com rede de água potável.
	Combate contra incêndio.	Incrustações, corrosão, filmes biológicos.
	Construção pesada.	
Recarga de aquíferos	Reforço dos aquíferos.	Disponibilidade de locais.
	Barreira contra a intrusão	Contaminação das águas subterrâneas.
	Salina.	Aumento do teor de SDT.
	Armazenamento.	Efeitos toxicológicos devidos a compostos orgânicos.
Usos recreativos e ambientais	Lagos e lagoas artificiais.	Eutrofização.
	Reforço do caudal de cursos de água.	Ligações cruzadas com rede de água potável.
	Reforço de zonas húmidas.	Toxicidade para a vida aquática.
	Neve artificial.	
Usos urbanos não potáveis	Descarga de autoclismos.	
	Fontes e jogos de água ornamentais.	
	lavagem de veículos.	Ligações cruzadas com rede de água potável.
	Lavagem de ruas.	Incrustações, corrosão, filmes biológicos.
	Lavagem de contentores de RSU.	Aceitação pública

	Combate a incêndios.	Saúde pública.
	Varrimento de coletores.	
	Fusão de neve.	
	Condicionamento de ar.	

A reutilização de águas residuais é uma prática vantajosa para a generalidade dos sectores industriais, uma vez que, além das vantagens económicas e ambientais, se enquadra nas estratégias de gestão eco-eficiente que a maioria das indústrias utiliza no âmbito da implementação de sistemas de gestão ambiental. As unidades que podem tirar maior benefício desta prática são as que produzem maiores volumes de efluentes, destacando-se as seguintes: cerâmica, curtumes, extração, tratamento e transformação de pedra natural, petroquímica; produção de tintas, vernizes e cola; produção de material elétrico e eletrónico; química; tratamento e transformação de madeiras; tratamento de superfície. Entre as utilizações mais comuns destacam-se as lavagens de espaços e equipamentos, a preparação de matérias-primas, os sistemas de aquecimento e refrigeração e em vários níveis de produção. As práticas de reutilização utilizam normalmente efluentes gerados nos próprios processos de produção, embora possa ser aproveitada água reutilizável de outra origem (ETAR municipais), desde que sejam garantidas as exigências de qualidade mínimas e que haja viabilidade técnica e económica para a sua aplicação (Monte & Albuquerque, 2010).

### 1.1.2. Qualidade da água utilizada na indústria

Cada tipo de indústria tem requisitos específicos de qualidade para a água que utiliza. Porém, alguns requisitos de qualidade da água são praticamente comuns, como sejam a necessidade de prevenir fenómenos de corrosão e de incrustação, bem como o desenvolvimento de biofilmes nas condutas e equipamentos acessórios. Os constituintes da água que afetam os fenómenos de corrosão e de incrustação, e que, de um modo geral, são relevantes na viabilidade da reutilização industrial da água, são as seguintes:



- Teores elevados de sólidos em suspensão;
- Ferro, cálcio e magnésio (podem originar incrustação em condutas e caldeiras);
- Sulfatos e sulfureto de hidrogénio (podem originar corrosão);
- Compostos orgânicos, oxigénio dissolvido e amoníaco (precursores do desenvolvimento de biofilmes em condutas, sistemas de armazenamento, permutadores de calor e sistemas de arrefecimento) (Monte & Albuquerque, 2010).

## 1.2. Biorremediação

A contaminação dos solos, águas subterrâneas, sedimentos, água de superfície e ar com produtos quimicamente perigosos e tóxicos, é um dos principais problemas que se colocam no mundo industrializado de hoje (Baker & Herson, 1994). Uma vez que a qualidade de vida está ligada intimamente com a qualidade em geral do ambiente, a atenção global tem sido focada em maneiras de sustentar e preservar o meio ambiente. Esse esforço é possível envolvendo a biotecnologia (Kumar *et al.*, 2011).

A biotecnologia ambiental pode ser utilizada para avaliar o bem-estar dos ecossistemas, tem a capacidade de transformar poluentes em substâncias benígnas, geram matérias biodegradáveis a partir de fontes renováveis e desenvolvem a produção ambientalmente segura e também os processos de eliminação. Vários pesquisadores em busca de tornar os processos biotecnológicos, na área ambiental, mais eficientes desenvolveram uma técnica chamada de biorremediação, que é uma abordagem emergente para reabilitar áreas contaminadas por poluentes ou outros malefícios causados por má gestão de ecossistemas (Vidali, 2001). O termo biorremediação foi introduzido para descrever o processo de utilização de agentes biológicos, principalmente microrganismos, para remoção de resíduos tóxicos do ambiente (Kumar *et al.*, 2011). Esta técnica usa bactérias, fungos ou plantas para degradar ou desintoxicar substâncias perigosas para a saúde humana e/ou o ambiente. Os microrganismos podem ser indígenas da área contaminada ou podem ser isolados de um outro local e serem levados para o sítio contaminado (Vidali, 2001).

### **1.2.1. Tipos de biorremediação**

Segundo Boopathy, (2000), as tecnologias de biorremediação podem ser classificadas como ex situ e in situ. As técnicas ex situ são os tratamentos que envolvem a remoção física do material contaminado para o processo de tratamento. Em contraste, as técnicas in situ envolvem o tratamento do material contaminado no lugar. Alguns exemplos de in situ e ex situ serão aqui apresentados:

1. Compostagem: aeróbico, processo de tratamento termofílico em que o material contaminado é misturado com um agente espessante; pode ser feito com pilhas estáticas ou pilhas aeradas.
2. Biorreatores: biodegradação feita num recipiente ou reator; pode ser usado para tratar líquidos ou pastas.
3. Bioaumentação: adição de culturas bacterianas para o meio contaminado; frequentemente usado tanto em sistema in situ como ex situ.
4. Bioestimulação: estimulação de populações microbianas indígenas em solos ou águas subterrâneas, fornecendo os nutrientes necessários.
5. Bioventilação: tratamento do solo contaminado através da passagem de oxigénio pelo solo para estimular o crescimento e a atividade microbiana.
6. Biorremediação intrínseca: biorremediação desassistida do contaminante; apenas a monitorização regular é feita.
7. Bombear e tratar: bombeamento de água do solo para a superfície, tratamento e reinjeção.

#### **1.2.1.1. Vantagens da biorremediação:**

Para a biorremediação ser bem sucedida os métodos de biorremediação dependem de ter os microrganismos certos no lugar certo e dos fatores ambientais adequados para degradação ocorrer. Esses microrganismos têm capacidades metabólicas e fisiológicas que lhes dão a possibilidade de degradar os poluentes (Boopathy, 2000). Posto isto a biorremediação apresenta algumas vantagens, tais como:

- A biorremediação é um processo natural, verifica-se assim que este tratamento tem uma aceitação razoável pelo público;
- Teoricamente, elimina completamente uma vasta variedade de contaminantes. Muitos dos compostos que são considerados legalmente perigosos podem ser transformados em produtos inofensivos. Isso elimina a hipótese de responsabilidade futura associada com o tratamento e descarga do material contaminado (Kumar *et al.*, 2011);
- Pode ser menos dispendiosa que outras técnicas de eliminação de resíduos perigosos e ainda pode ser combinada com outros métodos de tratamento como os físicos ou os químicos.

#### **1.2.1.2. Desvantagens da biorremediação**

Embora a biorremediação seja considerada uma bênção no meio da atual situação ambiental, também pode ser considerada problemática (Vidali, 2001):

- A adição de aditivos para melhorar o desempenho de um microrganismo em particular pode ser prejudicial para outros organismos que habitam o mesmo ambiente, quando feito *in situ* (Vidali, 2001);
- A biorremediação é limitada a compostos biodegradáveis, e nem todos os compostos são susceptíveis a uma degradação rápida e completa (Kumar *et al.*, 2011);
- Os produtos da biodegradação podem ser mais persistentes ou tóxicos do que o composto inicial;
- Pode levar mais tempo do que outras opções de tratamento.

#### **1.2.2. Fitorremediação**

Fitorremediação é uma técnica de remediação que está relacionada com a utilização de algas ou de microalgas na remoção ou biotransformação de poluentes, onde se inclui os nutrientes e xenobióticos a partir de águas residuais e de CO<sub>2</sub> a partir do ar residual. Desde o trabalho inicial realizado por Oswald, 1963 esta área de

investigação tem desenvolvido. Tem-se utilizado microalgas para tratamentos terciários de águas residuais, como para muitas outras aplicações. Assim, fitorremediação compreende várias aplicações: (1) remoção de nutrientes a partir de águas residuais municipais e efluentes ricos em matéria orgânica; (2) remoção de nutrientes e compostos xenobioticos com a ajuda de biosorventes baseados em algas; (3) tratamento de efluentes ácidos e com metais; (4) fixação de CO<sub>2</sub>; (5) transformação e degradação de xenobioticos; (6) deteção de compostos tóxicos, com o auxílio de biossensores baseados em algas (Olguín, 2003).

### 1.3. Microalgas

As microalgas são organismos importantes nos ecossistemas aquáticos, formam a base da maioria das cadeias tróficas aquáticas (Moreno-Garrido, 2008). São organismos unicelulares fotossintéticos com requisitos relativamente simples para o seu crescimento, são capazes de utilizar a energia solar para combinar água com dióxido de carbono para criar biomassa e potenciais nutrientes, tais como proteínas, aminoácidos, lípidos, polissacarídeos, carotenoides e outras moléculas biologicamente ativas (Asha *et al.*, 2011 e Mulbry *et al.*, 2008). Podem ser promissoras como matéria-prima de biomassa, devido ao rápido crescimento, alta reprodução e baixa emissão de gases de efeito estufa (Chisti, 2007).

As culturas de microalgas são uma boa uma solução para tratamentos de água residual, devido à sua capacidade de usar azoto e fosforo inorgânico para o seu crescimento (Richmond, 1986; Oswald, 1988 a,b; Garbisu *et al.*, 1991, 1993,. Tam & Wong, 1995) e também, a sua capacidade para remoção de metais pesados (Rai *et al.*, 1981), bem como alguns compostos orgânicos tóxicos (Redalje *et al.*, 1989), e não geram poluição adicional quando a biomassa é colhida.

Dentro do grupo de microalgas unicelulares pode-se destacar para o uso efetivo da imobilização e remoção de poluentes a espécie *Chlorella vulgaris* (Figura 2). É uma alga de água doce usada para o tratamento terciário de águas residuais, principalmente para a remoção de compostos de azoto, fósforo e metais pesados (Aksu *et al.*, 1992; Tam *et al.*, 1998). Também é utilizada para vários processos industriais de tratamento de águas residuais (Kayano *et al.*, 1981; Wikstrom *et al.*, 1982).



Figura 2-*Chlorella vulgaris* (Pavel Škaloud).

### 1.3.1. Imobilização de microalgas para tratamento de águas residuais

Um dos problemas principais na utilização de microalgas para o tratamento biológico de águas residuais é a sua recuperação a partir do efluente tratado (Chevalier & De la Noüe, 1985a,b). Técnicas de imobilização têm sido estudadas para colmatar este problema (De la Noüe & Proulx, 1988), oferecendo diversas vantagens em comparação com a fermentação contínua ou descontínua, onde são utilizados microrganismos livres (Hall & Rao, 1989).

Uma célula imobilizada é definida como uma célula que por meios naturais ou artificiais é impedido de se mover independentemente da sua localização original para todas as partes da fase aquosa de um sistema (Tampion & Tampion, 1987). O conceito subjacente, diz que as microalgas imobilizadas em matrizes biológicas ou inertes, podem ajudar nas vantagens biotecnológicas exigidas, da cultura em massa da microalga, ou num metabolito específico ou na remoção de poluentes. Este conceito evoluiu a partir da natureza básica dos seus componentes, as microalgas e da matriz de imobilização (De-Bashan & Bashan, 2010). Podem ser distinguidos 6 tipos diferentes de imobilização:

- Par covalente;
- Imobilização por afinidade;
- Absorção;

- Confinamento em emulsão de líquido – líquido;
- Captura por detrás de uma membrana semipermeável;
- Encapsulamento em polímeros (Mallick, 2002).

Encapsulamento é o método mais utilizado em experiências laboratoriais. Os métodos de encapsulamento baseiam-se no isolamento de células numa rede de gel tridimensional. As células são livres nos seus compartimentos e os poros do material permitem que substratos e produtos se difundam de e para as células. Para o encapsulamento em gel a matriz de imobilização pode ser um polímero sintético (acrilamida, poliuretano, polivinilo, etc), ou um polímero natural (colagénio, agar, agarose, celulose, alginato, carragenina, etc) (Hameed & Ebrahim, 2007). De entre as matrizes mencionadas anteriormente, o alginato é muito adequado, pois fornece um sistema estável e poroso com boa viabilidade celular

Nos sistemas de imobilização com polímeros, existe uma separação física entre os microrganismos e a água residual tratada. Os microrganismos são imobilizados (presos) vivos dentro do polímero, porque os poros são menores que os microrganismos, ao passo que o fluido passa através dele e apoia o seu metabolismo e eventual crescimento (Cohen, 2001).

Imobilização de microalgas para tratamento de águas residuais é baseado no princípio de manter as células vivas dentro de uma matriz de gel metabolicamente ativa tanto tempo quanto possível, durante os quais eles têm mobilidade limitada. Em raras ocasiões, uma massa morta de microalgas também pode ser utilizado. Muitos polímeros podem cumprir esta exigência (De-Bashan & Bashan, 2010). Os principais problemas ao usar qualquer uma delas são:

1. Eficiência do sistema de remoção de poluentes;
2. Custo do polímero;
3. Custo do processo de imobilização (De-Bashan & Bashan, 2010).

Os principais métodos de imobilização apresentam as seguintes vantagens (De-Bashan & Bashan, 2010):

1. O concentrado de biomassa produzida pode ser utilizado como um subproduto;
2. Evita a filtração da água residual tratada;

3. Tem uma alta resistência a compostos tóxicos dentro das águas residuais tratadas;
4. Pode utilizar mais do que um microrganismo;
5. É de aplicação simples.

### **1.3.2. Remoção de nutrientes da água residual pelas microalgas imobilizadas**

O tratamento biológico de águas residuais com algas para remover nutrientes, como o nitrogénio e fósforo e o fornecimento de oxigénio para bactérias aeróbias foi proposto há 50 anos por Oswald & Gotaas (1957). As principais formas em que elas ocorrem nas águas residuais são:  $\text{NH}_4^+$  (amónia),  $\text{NO}_2^-$  (nitrito),  $\text{NO}_3^-$  (nitrato),  $\text{PO}_4^{3-}$  (ortofosfato). As águas residuais são tratadas essencialmente por degradação biológica aeróbia ou anaeróbia, no entanto, a água tratada contém ainda compostos inorgânicos tais como nitrato, amónio e iões de fosfato, o que leva à eutrofização dos lagos e causa a proliferação de microalgas nocivas (Sawayama *et al.*, 1998). A capacidade das microalgas imobilizadas para remover nutrientes de águas residuais demonstram grande eficiência, a Tabela 2 apresenta vários exemplos. Lau *et al.* (1998) Obtiveram eficiências máximas de remoção de azoto e fósforo de 95% e 100% com a utilização da microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada em carragenina. *Chlorella vulgaris*, imobilizada em carragenina e alginato foi utilizado para tratar águas residuais domésticas primárias. As células de algas, tanto em carragenina como em alginato cresceram mais lentamente do que em células em suspensão, mas as células imobilizadas estão metabolicamente mais ativas. Mais de 95% de amónio e 99% de fosfatos foram removidos a partir do efluente em 3 dias. Tendo sido mais eficiente do que as células em suspensão visto que removeram apenas 50% de N e de P no mesmo período de tempo (Lau *et al.*, 1997).

Tabela 2-Remoção de azoto e fósforo por microalgas imobilizadas (De-Bashan &amp; Bashan, 2010)

Pollutant	Immobilizing material	Microalgae species	Reference
Nitrogen	Alginate	<i>Anabaena</i> sp.; <i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. sorokiniana</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Isochrysis galbana</i> ; <i>Scenedesmus obliquus</i>	Chen (2003), de-Bashan et al. (2002a,b, 2004, 2008), Hernandez et al. (2009), Jeanfils et al. (1993), Jeanfils and Thomas (1986), Lee et al. (1995), Mallick and Rai (1993) and Vilchez and Vega (1994, 1995)
	Polyvinyl foam Polyurethane and polyvinyl foam	<i>Phormidium uncinatum</i> <i>Phormidium laminosum</i> ; <i>S. obliquus</i>	Gil and Serra (1993) Garbisu et al. (1991) and Urrutia et al. (1995)
	Filter paper	<i>Trentepohlia aurea</i>	Abe et al. (2003)
Phosphorus	Alginate	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. sorokiniana</i> ; <i>C. emersonii</i>	Hernandez et al. (2006, 2009), Robinson (1995), Robinson et al. (1988, 1989) and Robinson and Wilkinson (1994)
Nitrogen + phosphorus	Alginate	<i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. sorokiniana</i> ; <i>C. kessleri</i> ; <i>C. emersonii</i> ; <i>Chlorosarcinopsis</i> sp.; <i>Dunaliella salina</i> ; <i>Euglena</i> sp.; <i>Macrochloris</i> sp.; <i>Nannochloris</i> sp.; <i>Palmellopsis gelatinosa</i> ; <i>Scenedesmus bijugatus</i> ; <i>S. intermedius</i> ; <i>S. quadricauda</i> ; <i>S. bicellularis</i> ; <i>Selenastrum capricornutum</i>	Abdel Hameed (2007), de-Bashan et al. (2002b, 2004), Faafeng et al. (1994), Garbayo et al. (1996), Jimenez-Perez et al. (2004), Kaya et al. (1995, 1996), Kaya and Picard (1995), Lau et al. (1997), Mallick and Rai (1993, 1994), Megharaj et al. (1992), Pérez-Martínez et al. (in press), Rai and Mallick (1992), Robinson et al. (1989), Tam and Wong (2000), Tam et al. (1994), Thakur and Kumar (1999a), Travieso et al. (1992, 1996) and Zhang et al. (2008)
	Carrageenan	<i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. kessleri</i> ; <i>Scenedesmus obliquus</i> ; <i>S. quadricauda</i> ; <i>S. acutus</i> ; <i>Spirulina maxima</i>	Cañizares et al. (1993, 1994), Chevalier and de la Noüe (1985a,b), Lau et al. (1997, 1998a,b), Mallick and Rai (1994) and Travieso et al. (1996)
	Chitosan	<i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Phormidium</i> sp.; <i>Scenedesmus bicellularis</i> ; <i>Scenedesmus</i> sp.; <i>S. obliquus</i> ; <i>Synechococcus elongates</i>	Aguilar-May and Sánchez-Saavedra (2009), de la Noüe and Proulx (1988a,b), Fierro et al. (2008), Kaya and Picard (1996) and Mallick and Rai (1994)
	Polyurethane Polyvinyl foam and polyvinyl acetate-sulfate	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. kessleri</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i> ; <i>Phormidium laminosum</i>	and Travieso et al. (1996) Garbisu et al. (1992, 1993) and Huang et al. (2003)
	Polystyrene Cellulose fibres Micro- and macro-porous fibrous tissue	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. kessleri</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i> <i>Phormidium laminosum</i> <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus rubescens</i>	Travieso et al. (1996) Sawayama et al. (1998) Shi et al. (2007)

### 1.3.3. Remoção de metais pesados de águas residuais pelas microalgas imobilizadas

As indústrias estão constantemente a gerar águas residuais ricas em metais pesados ou derivados de metais pesados. Devido a este facto há uma preocupação mundial, o que tem levado à formulação de regulamentos legais mais exigentes para controlar os poluentes das indústrias, apesar de alguns países não cumprirem. As descargas de metais pesados provenientes das águas residuais industriais permanecem nos sedimentos e são lentamente libertados no corpo de água, criando assim uma fonte de poluição a longo prazo sustentável (De la Noüe & De Pawn, 1988).

O uso de sistemas biológicos para a remoção de iões metálicos das águas poluídas, tem mostrado potencial para atingir uma melhor performance a um custo mais baixo que as tecnologias convencionais de tratamentos de águas residuais



(Wilde & Benemann, 1993). A utilização de microalgas imobilizadas com células metabolicamente ativas é uma opção particularmente atraente em aplicações onde é necessário níveis extremamente baixos de iões de metais residuais (Wilde & Benemann, 1993), para os processos de descontaminação, e para recuperação de metais (Greene & Bedell, 1990). Pequenas quantidades de metais pesados são essenciais como co-fatores para várias atividades enzimáticas das microalgas, mas elas não toleram concentrações elevadas de metais pesados. No entanto, algumas microalgas podem absorver grandes quantidades de metais pesados a partir de águas residuais e armazená-los em diferentes estruturas citoplasmáticas sem consequências tóxicas. Elas utilizam quantidades vestigiais de metais essenciais para o crescimento e metabolicamente ignoram os metais pesados não essenciais. As microalgas têm uma afinidade com metais polivalentes, levando a sua aplicação como agentes de limpeza de água e de águas residuais que contêm iões metálicos dissolvidos. Para a remoção de metais, as microalgas de escolha são geralmente espécies de *Chlorella* e *Scenedesmus* (De-Bashan & Bashan, 2010). As microalgas *A. Doliolum* e *C. vulgaris* imobilizadas em alginato apresentam, relativamente às células livres, taxas de captação mais elevadas para o cobre e o ferro, o que sugere que a imobilização oferece alguma proteção contra a toxicidade do metal (Rai & Mallick, 1992).

Vários casos de remoção de metais pesados e outros poluentes que envolvem microalgas imobilizadas podem ser observados na Tabela 3.

**Tabela 3-Remoção de metais pesados e outros poluentes por microalgas, macroalgas e cianobactérias imobilizadas (De-Bashan & Bashan, 2010).**

Pollutant	Immobilizing material	Microalgae species	Reference
Cadmium	Alginate	<i>Chlorella homosphaera</i> ; <i>C. vulgaris</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Oscillatoria</i> sp.; <i>Tetraselmis chuii</i>	Bayramoğlu et al. (2006), Cañizares-Villanueva et al. (2000), da Costa and Leite (1991), Katircioğlu et al. (2008) and Moreno-Garrido et al. (2005)
	κ-Carrageenan	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i>	Travieso et al. (1999)
	Polyurethane foam	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i>	Travieso et al. (1999)
	Surface of <i>Sargassum</i> sp.	<i>Spirulina maxima</i> ; <i>Tetraselmis chuii</i>	da Costa and de França (1996)
	Surface of <i>Ulva</i> sp.	<i>Spirulina maxima</i> ; <i>Tetraselmis chuii</i>	da Costa and de França (1996)
	Silica gel	<i>Spirulina platensis</i>	Rangasayatorn et al. (2004)
Cadmium and lead	<i>Luffa cylindrica</i> sponge	<i>Chlorella sorokiniana</i> ; <i>Synechococcus</i> sp.	Akhtar et al. (2003) and Saeed and Iqbal (2006)
	Milk casein + glutaraldehyde	<i>Heterosigma akashiwo</i>	Seki and Suzuki (2002)
Caesium	Alginate	<i>Chlorella salina</i>	Avery et al. (1993)
Chromium	Alginate; κ-carrageenan	<i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. miniata</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i> ; <i>S. obliquus</i> ; <i>Spirulina platensis</i>	Gokhale et al. (in press), Mallick and Rai (1993), Pellon et al. (2003), Tam et al. (2009) and Travieso et al. (1999)
	Agar	<i>Anacytis nidulans</i>	Khattar et al. (1999)
	Polyurethane foam	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i>	Travieso et al. (1999)
	<i>Luffa cylindrica</i> sponge	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Akhtar et al. (2008)
Cobalt	Alginate	<i>Chlorella salina</i>	Granham et al. (1992)
Copper	Polyurethane	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Travieso et al. (2002)
	Alginate	<i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. miniata</i> ; <i>Nannochloropsis gaditana</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i> ; <i>Tetraselmis chuii</i>	Bayramoğlu and Arica (2009), Lau et al. (1998c), Mehta and Gaur (2001), Moreno-Garrido et al. (2002, 2005), Rai and Mallick (1992) and Tam et al. (2009)
	Polyvinyl alcohol	<i>Sargassum baccularia</i>	Chu and Hashim (2001)
Gold	Alginate	<i>Chlorella homosphaera</i>	da Costa and Leite (1991)
Ferous	Alginate	<i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i>	Rai and Mallick (1992)
Lead	Alginate	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Abdel Hameed (2006) and Bayramoğlu et al. (2006)
	<i>Luffa cylindrica</i> sponge	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Akhtar et al. (2004a,b)

Manganese	Alginate	<i>Chlorella salina</i>	Granham et al. (1992)
Mercury	Silica gel Alginate Agarose	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Chlorella emersonii</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella emersonii</i>	Tajes-Martinez et al. (2006) Bayramoğlu et al. (2006) and Wilkinson et al. (1990) Wilkinson et al. (1990)
Nickel	Alginate	<i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. miniata</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i>	Bayramoğlu and Arica (2009), Al-Rub et al. (2004), Lau et al. (1998c), Mallick and Rai (1993, 1994), Mehta and Gaur (2001) and Tam et al. (2009) Akhtar et al. (2004a,b)
Zinc	Loofa sponges Alginate	<i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Chlorella homosphaera</i> ; <i>C. miniata</i> ; <i>C. salina</i> ; <i>Nannochloropsis gaditana</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i>	Bayramoğlu and Arica (2009), da Costa and Leite (1991), Granham et al. (1992), Moreno-Garrido et al. (2002) and Tam et al. (2009)
Uranium	κ-Carrageenan	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i>	Travieso et al. (1999)
Mixture of Cu, Fe, Ni, Zn	Polyurethane foam Polysulphone and epoxy resin	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i> <i>Chlorella regularis</i> <i>Phormidium laminosum</i>	Travieso et al. (1999) Nakajima et al. (1982) Blanco et al. (1999)
Other pollutants			
Hydrocarbons	Polyurethane foam Alginate	<i>Prototheca zopfii</i> <i>Selenastrum capricornutum</i>	Ueno et al. (2006, 2008) and Yamaguchi et al. (1999) Tam et al. (2009)
Organotin compounds (biocides)	Alginate	<i>Chlorella emersonii</i> ; <i>C. vulgaris</i>	Luan et al. (2006), Tam et al. (2009) and Zhang et al. (1998)
LAS (surfactant)	Alginate	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Moreno-Garrido et al. (2007)
Mix of phenols, oil spill and heavy metals	Capron fibers (synthetic)	<i>Chlorella</i> sp.; <i>Phormidium</i> sp.; <i>Scenedesmus obliquus</i> ; <i>Stichococcus</i> sp.	Safonova et al. (2004)

## 2. Objetivos

Este estudo teve como objetivo avaliar a remoção de fosfatos e ferro pela microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato de sódio de uma água residual industrial e de reutilização, para minimizar o impacto da água do circuito de refrigeração, no que respeita aos fenómenos de incrustação e corrosão das paredes do forno.

## 3. Material e Metodologia

### 3.1. Amostragem

A água residual industrial e de reutilização foi recolhida numa empresa situada em Vila Formoso em Novembro de 2012 e Fevereiro de 2013. A água recolhida foi mantida no congelador, para posteriormente ser analisada.

## 3.2. Microalga utilizada

Para o presente estudo de biorremediação da água residual industrial a microalga escolhida foi a *Chlorella vulgaris*. Esta microalga tem forma esférica, cerca de 2 a 10 µm de diâmetro e não tem flagelos. É uma alga verde, unicelular, fotoautotrófica e pertence ao filo *Chlorophyta*. A escolha desta microalga deve-se ao facto de ela ser facilmente cultivada em laboratório e também se multiplicar rapidamente, necessitando apenas de dióxido de carbono, água, luz solar e uma pequena quantidade de nutrientes para se reproduzir.

### 3.2.1. Preparação do meio e início da cultura de *Chlorella vulgaris*

A preparação do meio para a cultura de algas iniciou-se a 23 de Novembro de 2012, e o meio escolhido foi o MBL (Marine Biological Culture). Numa fase inicial pesaram-se os reagentes para preparar os macronutrientes, micronutrientes, vitaminas (gentilmente cedidas pelo CIIMAR) e tampão. Todos os componentes do referido meio estão mencionados na tabela 4. Na preparação dos macronutrientes e micronutrientes os reagentes inicialmente precipitaram, verificando-se que cada reagente deveria ser preparado individualmente ao invés de se preparar unicamente duas soluções, uma com os reagentes todos dos macronutrientes e outra com os dos micronutrientes, ambas num volume de 250 ml. Para corrigir o problema as soluções foram diluídas 4x ficando assim com um volume de 1 litro cada. As soluções de macro, micronutrientes e tampão foram mantidas no frigorífico.

Tabela 4-Lista de macro e micronutrientes, tampão e vitaminas do meio MBL.

Fórmula Química	Quantidade por litro (g/L)	Quantidade por litro de meio (mL/L)	Para 250 mL de água U.P., pesar (g)
<b>Macronutrientes</b>			
$\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	36,76	1mL/L	9,190
$\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$	39,97	1mL/L	9,242
$\text{NaHCO}_3$	12,60	1mL/L	3,150
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	8,71	1mL/L	2,177
$\text{NaNO}_3$	85,01	1mL/L	21,252
$\text{NaSiO}_3 \bullet 9\text{H}_2\text{O}$	28,42	1mL/L	7,105
<b>Micronutrientes</b>			
$\text{Na}_2\text{EDTA} \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	4,36	1mL/L	1,087
$\text{FeCl}_3 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$ (*)	3,15	1mL/L	0,787
$\text{CuSO}_4 \bullet 5\text{H}_2\text{O}$	0,01	1mL/L	0,0025
$\text{ZnSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$	0,022	1mL/L	0,0055
$\text{CoCl}_2 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$	0,01	1mL/L	0,0025
$\text{MnCl}_2 \bullet 4\text{H}_2\text{O}$	0,18	1mL/L	0,0450
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	0,006	1mL/L	0,0015
<b>Tampão</b> (ajustar o pH para 7.2 com HCl)			
Tris (hidroximetil)-aminometano	50g/200mL	2mL/L	62,5
<b>Vitaminas</b>			
Thiamina HCl (B1)	0,1 mg/L	1mL/8L	Ver preparação de vitaminas
Biotina (H1)	0,5 µg/L		
Cianocobalamina (B12)	0,5 µg/L		

(\*) - Fotossensível. Proteger da luz com papel de alumínio.

O meio foi preparado num balão de fundo redondo de 6 litros, onde se encheu o mesmo com 4 litros de água destilada e de seguida introduziu-se 1ml de macro e micronutrientes por cada litro de meio, mas como se diluiu as soluções 4x a quantidade foi quadruplicada, ou seja, 4 ml por cada litro de meio. A solução tampão também foi colocada, 2 ml por cada litro de meio. Fecha-se o sistema (Figura 3) e leva-se a autoclavar a 120°C durante 60 minutos.

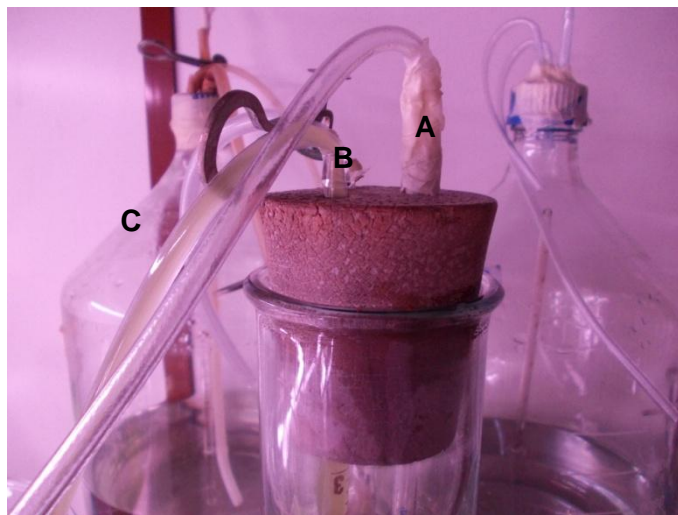


Figura 3-Sistema da cultura de *Chlorella vulgaris*. A-tubo para arejamento; B-tubo para saída de cultura; C-tubo de pressão.

Para garantir as condições de assepsia trabalhamos á chama, seguiu-se a introdução 0,5 ml de vitaminas e para finalizar colocou-se 10 ml de inoculo de *Chlorella vulgaris*. A cultura foi colocada numa sala com uma temperatura de  $25 \pm 2$  °C e com arejamento constante.

### 3.3. Matriz de gel escolhida

O alginato de sódio foi a matriz de gel escolhida para imobilizar as microalgas de *Chlorella vulgaris*. A escolha deste gel deve-se ao fato de ela ser extensivamente utilizada na imobilização de células viáveis. A formação do gel ocorre rapidamente na presença de iões de cálcio, sem alterações drásticas de temperatura, pH e pressão osmótica, e por isso a atividade e a viabilidade dos microrganismos imobilizados são conservados. Para além disso outras vantagens que se podem referir são o seu baixo custo, grande disponibilidade no mercado e possibilidade de ampliação de escala de produção (Canilha *et al.*, 2006).

### **3.3.1.Preparação da solução de alginato de sódio e de cloreto de cálcio**

Preparou-se a solução de alginato de sódio a 1,25%, isto significa, que 1,25g de pó de alginato se diluiu em 100 ml de água destilada, este procedimento teve de se realizar com cuidado para não haver formação de grumos.

Logo de seguida preparou-se a solução de cloreto de cálcio a 1%, para isso pesou-se 1,02g de  $\text{CaCl}_2$  para 100 ml de água.

### **3.3.2.Preparação das esferas de alginato e imobilização das microalgas**

Numa primeira fase foi realizada a contagem das células de microalgas, para isso foi necessário homogeneizar a cultura e de seguida retirar uma amostra para através da câmara de Neubauer fazer a contagem.

Feita a contagem, retirou-se uma outra amostra de 80 ml e dividiu-se por 8 tubos para os colocar a centrifugar a 3500 rpm durante 10 min (cada tubo levou 10 ml de amostra). Terminada a centrifugação rejeitou-se o sobrenadante com a ajuda de uma pipeta de Pasteur, restando apenas no fundo dos tubos o depósito das microalgas. O passo seguinte foi suspender o depósito de três tubos em 50 ml de água destilada para formar uma suspensão algal com uma densidade de  $19,2 \times 10^6$  cél./ml (concentração baixa). Para iniciar o processo de produção de esferas adicionou-se a esta suspensão algal a 50 ml solução de alginato a 1,25% preparada anteriormente, sendo depois transferida para uma bureta de 25 ml. De seguida deixou-se cair o preparado (suspensão de algas+alginato) sobre a solução de  $\text{CaCl}_2$  (1%), mantendo esta sempre sobre agitação para as esferas não agregarem (Figura 4). Para o processo de endurecimento ser eficaz manteve-se as esferas 40 minutos na solução de  $\text{CaCl}_2$ . Passados os 40 minutos as esferas são sujeitas a um processo de limpeza para eliminar qualquer tipo de vestígio da solução de  $\text{CaCl}_2$ , para isso foi necessário transferir as esferas para um funil com um papel de filtro, seguindo-se uma lavagem

com água destilada. Este método produziu á volta de 2350 esferas de microalgas com um diâmetro de 4mm (adaptado de Ruiz-Marin *et al.*, 2010).

Todo o processo anterior foi repetido, usando o depósito de 5 tubos obtendo assim uma suspensão algal com uma densidade de  $32,1 \times 10^6$  cél/ml, desta forma obtivemos a concentração mais alta.

As esferas vazias foram feitas da mesma forma que as esferas com microalgas só que substituiu-se os 50ml de suspensão algal por 50 ml de água destilada.

No final as esferas ficaram em água destilada à temperatura ambiente durante um dia. No outro dia quando já preparada a água residual a testar eliminou-se a água destilada onde estavam as esferas e por fim foram colocadas na água residual.

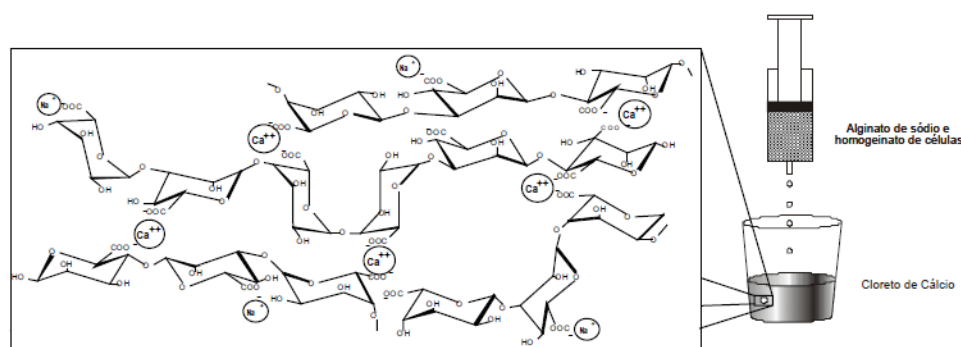


Figura 4-Formação de esferas de alginato de sódio (Covizzi *et al.*, 2007)

### 3.4. Desenho experimental

Neste trabalho utilizou-se somente a água bruta, foram escolhidos quatro tipos de tratamentos e cada um deles foi repetido três vezes (Figura 5). Para cada tipo de tratamento utilizaram-se as seguintes configurações: imobilizada concentração baixa (IC-), imobilizada concentração mais alta (IC+), esferas vazias (EV) e Água residual (AR). Foram utilizados fundos de garrafas para colocar 600 ml de água residual e de seguida inserir as esferas respetivas a cada tipo de tratamento. Todo o processo se realizou no laboratório do boga com uma temperatura de 27°C que foi controlada através de um sistema de banho-maria, controlada com um termostato e com arejamento, com o intuito de simular as condições a que a água residual está sujeita. As colheitas das amostras foram realizadas de 48h em 48h durante 10 dias.

### Água Residual Bruta

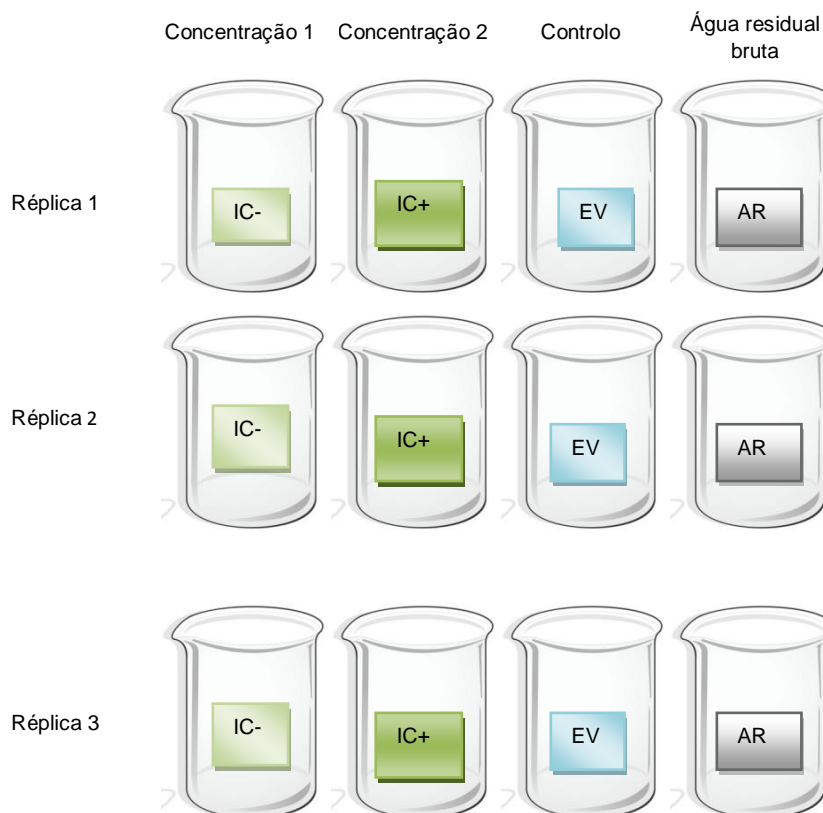


Figura 5-Esquema da experiência da remoção de fosfatos e ferro da água residual industrial por células imobilizadas. IC- e IC+ concentrações imobilizadas nas esferas; AR e EV controlos

### 3.5. Técnicas de lavagem de material e preservação de amostras para testes físico-químicos

Para a recolha das amostras ser feita com total eficiência foi necessário lavar os frascos e tampas com detergentes isentos de fosfatos (cedido pela empresa quimilord) e enxaguar com água corrente. De seguida preparou-se uma solução de 500 ml de ácido nítrico a 10%, como a existente era de 20% foi necessário retirar 250 ml desta e juntar a 250 ml de água destilada. A lavagem terminou com esta solução, ou seja, teve-se de lavar todos os frascos com a solução de  $\text{HNO}_3$  a 10% e depois enxaguar pelo menos cinco vezes com água destilada.

Para a preservação das amostras para análise de fosfatos só foi necessário colocar a congelar, no caso da análise do ferro foi necessário colocar 120  $\mu\text{l}$  de ácido nítrico a 65%, isto para obter um  $\text{pH} < 2$  e depois congelar.



### 3.6. Análise das amostras

Após 48 horas do início da experiência foram retiradas amostras da água residual, após homogeneização dos balões, a análise das amostras para determinar a concentração de fosfatos, foram realizadas pelo fotómetro da HANNA, Instruments - C200 Multiparameter Ion Specific Meter. Para a análise das amostras de ferro foi necessário o estojo de testes para ferro gama alta com disco Checker., Todas as análises foram realizadas com o devido reagente e técnicas exigidas. Este procedimento foi repetido às 96 horas, 144 horas, 192 horas e 240 horas após o início da experiência, terminando a experiência às 240 horas. Uma amostra inicial da água residual também foi retirada para análise.

### 3.7. Análise estatística

As médias e desvios padrão das concentrações dos diferentes tratamentos foram comparados separadamente para cada intervalo de tempo, tanto para o fosfato como para o ferro.

Os testes de normalidade (com  $\text{sig} > 0,05$ ) revelaram que os resultados são paramétricos. Assim, as médias entre as réplicas foram comparadas através do teste ANOVA (com  $\text{sig} > 0,05$ ), verificamos que não existiram diferenças significativas nos dois casos, como se pode verificar na (figura 6 e 7 em anexo). As médias entre tratamentos também foram comparados através do teste ANOVA (com  $\text{sig} > 0,05$ ), concluímos que não existiram diferenças significativas nos dois casos, (figura 8 e 9 em anexo). Os gráficos foram obtidos através do teste One-way ANOVA.

Toda a análise estatística foi realizada no programa IBM SPSS Statistics 21. As tabelas dos resultados foram feitas em folhas de cálculo do Excel.

## 4. Resultados

### 4.1. Remoção de fosfatos

Nas primeiras 48 horas registamos uma diminuição da concentração de fosfatos em todos os tipos de tratamentos, nos controlos as percentagens de remoção foram: 79% na AR e 77,5% nas EV. Quanto aos tratamentos com células imobilizadas as percentagens de remoção foram de: 45% na IC- e 55% na IC+.

As horas seguintes apresentaram variações, aumentos e diminuições na concentração de fosfatos.

No final das 240 horas as percentagens de remoção no caso dos controlos foram: 72% na AR e 53% nas EV. No caso das células imobilizadas as percentagens de remoção foram: 38% na IC- e 48% na IC+, como se pode verificar na Tabela 5.

**Tabela 5-Média das concentrações e respetivos desvios padrão, dos fosfatos (mg/L), obtidos para a água residual industrial.**

Tempo (horas)	IC- [ $\text{PO}_4^{3-}$ ] mg/L $\pm$ DP	IC+ [ $\text{PO}_4^{3-}$ ] mg/L $\pm$ DP	AR [ $\text{PO}_4^{3-}$ ] mg/L $\pm$ DP	EV [ $\text{PO}_4^{3-}$ ] mg/L $\pm$ DP
0	0,80 $\pm$ 0,00	0,80 $\pm$ 0,00	0,80 $\pm$ 0,00	0,80 $\pm$ 0,00
48	0,44 $\pm$ 0,08	0,36 $\pm$ 0,16	0,17 $\pm$ 0,14	0,18 $\pm$ 0,09
96	0,48 $\pm$ 0,13	0,47 $\pm$ 0,09	0,43 $\pm$ 0,09	0,38 $\pm$ 0,03
144	0,45 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,06
192	0,16 $\pm$ 0,11	0,38 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,14	0,45 $\pm$ 0,05
240	0,49 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,06	0,38 $\pm$ 0,02

Pela análise da figura 10 observa-se que a maior remoção de fosfatos deu-se no controlo, ou seja, na água residual. Todos os tratamentos revelam causar diminuição da concentração de fosfatos no final das 240 horas em relação à concentração inicial.

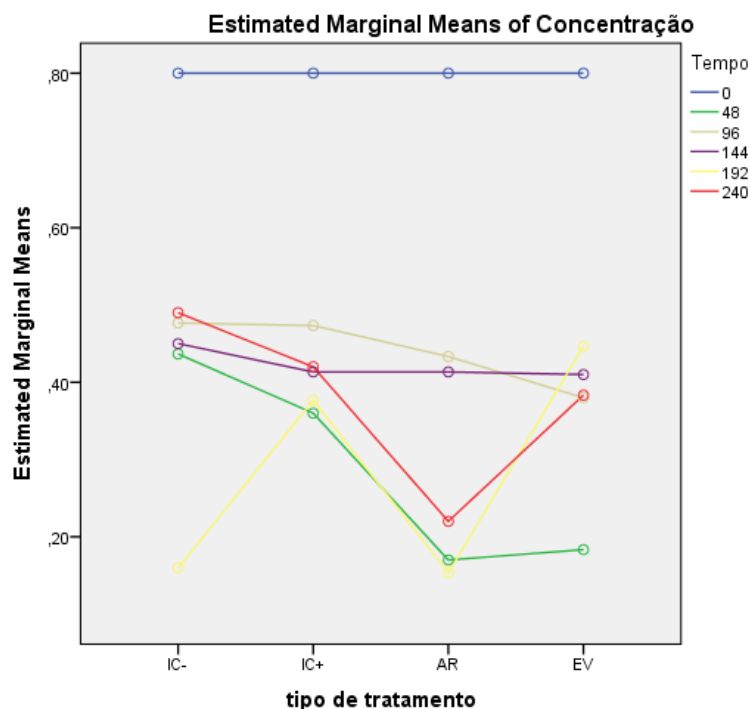


Figura 10 - Assimilação de fosfatos pela *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato. IC- imobilizada concentração baixa; IC+ imobilizada concentração alta; AR água residual; EV esferas vazias.

## 4.2. Remoção de ferro

Nas primeiras 48 horas as concentrações de ferro total diminuiu em todos os tratamentos, o tratamento com as células imobilizadas mais precisamente com a concentração mais baixa de *Chlorella vulgaris* teve uma percentagem de remoção de 63%, no caso das células imobilizadas com a concentração mais alta a percentagem de remoção foi de 52%. Nos controlos, água residual e esferas vazias, a concentração de ferro total diminuiu cerca 49% e 54% respetivamente.

Nas horas seguintes as concentrações foram sempre diminuindo, sendo que ao fim de 240 horas os tratamentos que tiveram 100% de eficácia foram, a imobilização com a concentração mais baixa e as esferas vazias. Os restantes tratamentos obtiveram uma remoção de 93% (imobilização com a concentração alta) e 99% (água residual) (Tabela 6).

Tempo (horas)	IC- [ $\text{Fe}_{\text{total}}$ ] mg/L $\pm$ DP	IC+ [ $\text{Fe}_{\text{total}}$ ] mg/L $\pm$ DP	AR [ $\text{Fe}_{\text{total}}$ ] mg/L $\pm$ DP	EV [ $\text{Fe}_{\text{total}}$ ] mg/L $\pm$ DP
0	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,00
48	1,83 $\pm$ 0,76	2,40 $\pm$ 0,40	2,53 $\pm$ 0,46	2,30 $\pm$ 0,26
96	0,50 $\pm$ 0,00	0,57 $\pm$ 0,21	0,60 $\pm$ 0,17	0,40 $\pm$ 0,00
144	0,40 $\pm$ 0,00	0,43 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,00	0,40 $\pm$ 0,00
192	0,40 $\pm$ 0,00	0,43 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,12	0,47 $\pm$ 0,12
240	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,12	0,07 $\pm$ 0,12	0,00 $\pm$ 0,00

Tabela 6-Média das concentrações e respetivos desvios padrão, do ferro (mg/L), obtidos para a água residual industrial

Pela figura 11 os resultados obtidos na remoção de ferro, observamos que nas primeiras 48 horas ocorre uma considerável diminuição de concentração de ferro em todos os tratamentos destacando-se o tratamento que utiliza células imobilizadas e com a concentração mais baixa. Nas horas seguintes ocorre uma diminuição grande em todos os tipos de tratamentos mas no final das 240 horas dois tipos de tratamentos obtêm uma eficácia de 100%, mais precisamente o tratamento com as células imobilizadas com a concentração mais baixa e o outro é o que utiliza as esferas vazias.

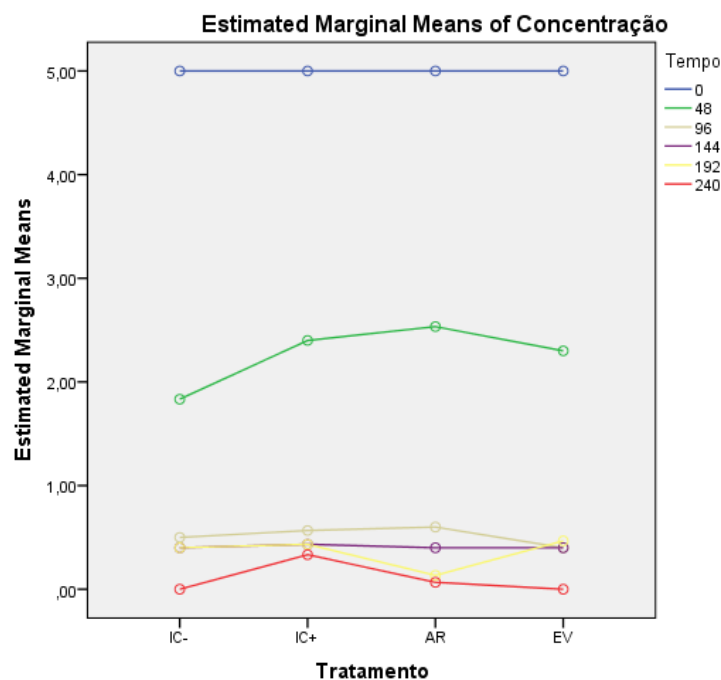


Figura 11 - Assimilação de ferro pela *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato. IC- imobilizada concentração baixa; IC+ imobilizada concentração alta; AR água residual; EV esferas vazias.

## 5. Discussão

Neste estudo no caso da remoção de fosfatos esperávamos uma maior ou uma total eficiência nas primeiras horas no tipo de tratamento em que envolve a utilização de microalgas imobilizadas, isto porque segundo Lau *et al.*, 1997 a *Chlorella vulgaris* imobilizada em esferas apresenta uma taxa de remoção para os fosfatos de 99% em três dias. Nas primeiras 48 horas houve uma diminuição da concentração de fosfato em todos os tipos de tratamento, 45 % (IC-), 55%, (IC+), 79% (AR) e 77,5% (EV) resultados mais eficientes em comparação com as concentrações obtidas ao fim das 240 horas, 38%, 48%, 72% e 53%, respetivamente. Os resultados registados às 96 horas, 144 horas e 192 horas apresentaram variações que correspondem a acumulações e diminuições da concentração de fosfato. As possíveis causas para as variações podem ser:

- Falta de filtração da água residual, sendo assim esta poderia ter presente microrganismos desconhecidos e consequentemente aumentar a taxa de mortalidade da microalga *Chlorella Vulgaris*, podendo libertar fosfatos já assimilados e as ainda vivas continuar a assimilar alguns fosfatos.
- Fatores físicos e fatores bióticos. O crescimento das algas e absorção de nutrientes não são apenas afetados pela disponibilidade de nutrientes, elas também dependem de interações complexas entre fatores físicos, tais como pH, temperatura e fatores bióticos. O fator biótico que influencia significativamente o crescimento de algas é a densidade, espera-se que quanto maior a densidade de algas, melhor será o crescimento e a maior a eficiência de remoção de nutrientes. No entanto, a elevada densidade de algas pode conduzir a auto-sombreamento, a acumulação de auto-inibidores, e uma redução na eficiência fotossintética (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).
- A matriz de gel pode-se ter danificado. Segundo Kaya & Picard, 1995 elas poderiam “chocar” umas nas outras perdendo assim alguma da sua integridade, levando as microalgas a perder a sua capacidade de remoção de fosfatos da água residual.

- Componentes desconhecidos presentes na água residual industrial, que em certas quantidades podem ser tóxicas para as microalgas e até mesmo alterarem a estrutura da matriz de gel.

Quanto à remoção do ferro Hameed 2002, refere que células de *Chlorella vulgaris* imobilizadas em alginato de sódio apresentam uma eficiência de 27%. Inicialmente na remoção do ferro esperávamos uma diminuição reduzida da concentração de ferro por isso optamos pelo prolongamento das horas com o objetivo de aumentar a eficiência na remoção de ferro, tendo em conta que as células com o tempo morreriam e passavam a acumular os metais e as ainda vivas a assimilar. Dönmez *et al.*, 1999, mencionam que as células mortas podem ser muito eficientes em acumular metais.

No caso da remoção do ferro os resultados foram satisfatórios e correram de acordo com o esperado, ao fim das 240 horas com a imobilização da *Chlorella vulgaris* em alginato de sódio, com a densidade de  $19,2 \times 10^6$  cél/ml, ou seja, com a concentração mais baixa, a percentagem de remoção foi de 100%, apesar de nas primeiras 48h a remoção de ferro ter sido também relativamente boa, 63% (IC-), 52% (IC+), 49% (AR) e 54%. Rai & Mallick 1992, sugerem que células de *Chlorella vulgaris* imobilizadas mostraram eficiência na remoção de ferro, verificando que a imobilização oferece alguma proteção contra a toxicidade do metal. Todos os outros tratamentos apresentaram percentagens igualmente interessantes, destacando sempre o tratamento com células de *Chlorella vulgaris* imobilizadas em alginato de sódio com a menor concentração visto que mesmo em 48 horas elas conseguem remover 63% de ferro.

Apesar de todas as observações feitas anteriormente no final do estudo tanto no caso da remoção de fosfato como no caso da remoção de ferro a diferença na assimilação de fosfatos e ferro pelas microalgas imobilizadas (concentração baixa e alta) e pelos controlos (sem microalgas), não foi estatisticamente significativa ( $\text{sig} > 0,05$ ) (Figura 8 e 9 em anexos).

## 6. Conclusões

Este estudo mostrou que mais de 40% dos fosfatos e 100% do ferro foram removidos da água residual industrial e de reutilização, ao fim de 10 dias, podendo-se enquadrar nas estratégias de gestão eco-eficientes que a generalidade das indústrias utiliza no âmbito do cumprimento de uma boa gestão ambiental.

Verificamos que a escolha da microalga *Chlorella vulgaris* e a opção de imobilização em alginato de sódio durante os 10 dias foi eficiente, no entanto ao fim de dois dias os resultados obtidos também podem ser uma boa opção, dependendo da escolha da aplicação a dar às águas tratadas para reutilizar.

Seria interessante, de futuro, avaliar o comportamento das microalgas sob outras concentrações de fosfatos e ferro, nomeadamente concentrações mais elevadas.

Esperamos que com este estudo, a contribuição para diminuir as desvantagens da reutilização de águas residuais e consequentemente evitar o uso excessivo dos recursos hídricos naturais, tenha sido positiva.

## 7. Bibliografia

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem, I.B.M., 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. **19**: 257-275.
- Aksu Z., Sag Y., Kutsal, 1992. The biosorption of copper (II) by *Chlorella vulgaris* and *Zoogloea ramigera*. *Environ Technol*. **13**: 579-86.
- Asano, T & Levine, A., 1996. Wastewater Reclamation, Recycling and Reuse: Past, Present, and Future. *Water Science & Technology*. **33**. no. 10-11, pp. 1-14.
- Asha, P., Nira, K.S., Ashok, P., Edgard, G., Datta, M., 2011. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresour. Technol*. **102**, 10163–10172
- Baker, K.H., Herson, D.S., 1994. Bioremediation. McGraw-Hill, New York, pp. 1±7.
- Bopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation *Technologies. Bioresource Technology* **74**: 63±67.
- Canilha, L., Carvalho, W., Silva, J.B.A., 2006. Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento ano IX*, nº36.
- Chevalier, P., De la Noüe, J., 1985a. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in Carrageenan. *Enzyme Microb. Technol*. **7**: 621–624.
- Chevalier, P., De la Noüe, P., 1985b. Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphate removal from wastewaters. *Biotechnol. Lett*. **7**: 395–400.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microaglae. *Biotechnol Adv*. **25**: 294–396.
- Cohen, Y., 2001. Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresour. Technol*. **77**: 257–274.
- Covizzi, L.G., Giese, E.C., Gomes, E., Dekker, R.F.H., Silva, R., 2007. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina. **28**, n.2, p. 143-160.



De-Bashan, L., Bashan, Y., 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology* **v.101**;1611-1627.

De la Noüe, J., De Pauw, N., 1988. The potential of microalgal biotechnology. A review of production and uses of microalgae. *Biotechnol. Adv.* **6**: 725–770.

Dönmez, G.C., Aksu, Z., Öztürk, A., Kutsal, T., 1999. A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochem.* **34**: 885–892.

Ferraz, A. I. & Rodrigues A. C., 2011. Biotecnologia, Ambiente e desenvolvimento sustentável. Pubindustria. Porto.

Garbisu C., Gil J.M., Bazin M.J., Hall, D.O., Serra L. 1991. Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors. *J Appl Phycol.* **3**: 221–234.

Garbisu C., Hall D.O., Serra J., 1993. Removal of phosphate by foam-immobilized *Phormidium laminosum*. *J Chem Technol Biotechnol* **57**: 181–189.

Greene, B., Bedell, G.W., 1990. Algal gels or immobilized algae for metal recovery. In: Akatsuka, I. (Ed.), *Introduction to Applied Phycology*. SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands, pp. 137–149.

Hall, D.O., Rao, K.K., 1989. Immobilized photosynthetic membranes and cells for the production of fuel and chemicals. *Chimicaoggi.* **3**, 40–47.

Hameed, M.S. A., 2002. Effect of Immobilization on growth and photosynthesis of the green alga *Chlorella vulgaris* and its efficiency in heavy metals removal. *Bull. Fac. Sci. Assiut University*, **31**: 233– 40

Hameed, M.S.A., 2006. Continuous removal and recovery of lead by alginate beads, free and alginate-immobilized *Chlorella vulgaris*. *African Journal of Biotechnology.* **5** (19): pp. 1819-1823.

Hameed, M.S.A., 2007. Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal. *African Journal of Biotechnology* **Vol. 6** (10), pp. 1185-1191.

Hameed, M.S.A.& Ebrahim, O.H., 2007. Review: Biotechnological Potential Uses of Immobilized Algae. *International Journal of Agriculture & Biology* 1560-8530/2007/09-1-183-192.

Kaya V.M., Picard G., 1995. The viability of *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on alginate screens following nutrient starvation in air at 100% relative humidity. *Biotechnol Bioeng.* 46:459-494.

Kayano H, Matsunaga T, Karube I, Suzuki S., 1981. Hydrogen evolution by co-immobilized *Chlorella vulgaris* and *Clostridium butyricum* cells. *Biochem Biophys Acta*; 638:80–5.

Kumar.A , Bisht.B.S, Joshi.V.D, Dhewa,T., 2011. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *International Journal of Environmental Sciences.* 1: No 6.

Lau P.S., Tam N.F.Y., Wong Y.S., 1997. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environ Technol.* 18, 945–951.

Lau P.S., Tam N.F.Y., Wong Y.S., 1998. Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technol.* 63: 115–121.

Mallick, N., 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *BioMetals.* 15, 377–39

Mancuso, P. C. S.; Santos, H. F., 2003. *Reuso de água*. 1. ed. São Paulo: Manole.

Metcalf & Eddy, 2003. *Wastewater engineering: Treatment and reuse*. Fourth edition, Metcalf & Eddy, Inc. New York.

Monte, H. & Albuquerque, A., 2010. *Reutilização de Águas Residuais*. Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Lisboa.

Moreno-Garrido, I., 2008. Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource technology.* 99; 3949-64

Mulbry, W., Kondrad, S., Buyer, J., 2008. Treatment of dairy and swine manure effluents using freshwater algae: fatty acid content and composition of algal biomass at different manure loading rates. *J. Appl. Phycol.* 20: 1079–1085.

Muttamara, S., 1996. Wastewater characteristics. *Resources, Conservation and Recycling*. **16**; 145-159.

Olguín, E., 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances*. **22**: 81–91

Oswald, W.J., 1988a. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro-algal Biotechnology*, Cambridge Univ. Press, pp. 305–328.

Oswald, W.J., 1988b. Large scale culture systems (engineering aspects). In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 357–394.

Oswald WJ., 1963. High rate ponds in waste disposal. *Dev Ind Microbiol*. **4**:112– 9

Oswald, W.J., Gotaas, H.B., 1957. Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Am. Soc. Civil. Eng.* **122**: 73–105.

Rai, L., Gour, J., Kumar, H., 1981. Phycology and heavy metal pollution. *Biol. Rev.* **56**, 99–151.

Rai, L.C., Mallick, N., 1992. Removal and assessment of toxicity of Cu and Fe to *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris* using free and immobilized cells. *World J. Microb. Biotechnol.* **8**, 110–114.

Redalje, D., Duerr, E., De la Noüe, J., Mayzaud, P., Nonomura, A., Cassin, R., 1989. Algae as ideal waste removers: biochemical pathways. In: Huntley, M.E. (Ed.), *Biotreatment of Agricultural Wastewater*. Press, Boca, Raton, CRC, pp. 91–110.

Richmond, A., 1986. Handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Boca Raton, Florida, 528 pp.

Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L. & Stephenson, T., 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*. **101**: 58–64.

Sawayama, S., Rao, K.K., Hall, D.O., 1998. Nitrate and phosphate ions removal from water by *Phormidium laminosum* immobilized on hollow fibres in a photobioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 463–468.

Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., 1995. Wastewater treatment with microorganisms. *The commercial Press* (H.K.) Ltd. 2D Finnie St. Quarry Bay, Hong Kong.

Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Simpson, C.G., 1998. Repeatedly removal of copper by alginate beads and the enhancement by microalgae. *Biotechnology Techniques*. **12**, 187–190.

Tampion, J., and Tampion, M., 1987. Immobilized cells. *Principles and Applications*, P: 257.

Vidali, M., 2001. Bioremediation An overview. *Pure Appl. Chem.* **73**, No.7, pp 1163–1172

Wikstrom P, Sz wajcer E, Brodelius P, Nilsson K, Mosbach K., 1982. Formation of keto acids from amino acids using immobilized bacteria and algae. *Biotechnol Lett.* **4**:153–8.

Wilde, E.W., Benemann, J.R., 1993. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnol. Adv.* **11**, 781–812.

## 8. Bibliografia eletrónica

Pavel Škaloud, 2006. *půdní a aerofytické zelené řasy*. Acedido em: 20 de Novembro de 2013, em: <http://botany.natur.cuni.cz/algo/determin.html>

## 9. Anexos

### ANOVA

Concentração

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,013	2	,007	,150	,861
Within Groups	3,061	69	,044		
Total	3,074	71			

Figura 6-Resultado da análise de variância ANOVA para assimilação de fosfatos na água residual. O valor sig é superior a 0.05, logo no final da experiência não houve diferenças significativas entre as diferentes réplicas.

### ANOVA

Concentração

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,108	2	,054	,017	,983
Within Groups	222,588	69	3,226		
Total	222,695	71			

Figura 7-Resultado da análise de variância ANOVA para assimilação de ferro na água residual. O valor sig é superior a 0.05, logo no final da experiência não houve diferenças significativas entre as diferentes réplicas.

### ANOVA

Concentração

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,157	3	,052	1,221	,309
Within Groups	2,917	68	,043		
Total	3,074	71			

Figura 8-Resultado da análise de variância ANOVA para assimilação de fosfatos na água residual. O valor sig é superior a 0.05, logo no final da experiência não houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

### ANOVA

Concentração

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,274	3	,091	,028	,994
Within Groups	222,421	68	3,271		
Total	222,695	71			

Figura 9-Resultado da análise de variância ANOVA para assimilação de ferro na água residual. O valor sig é superior a 0.05, logo no final da experiência não houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.